

Deteksi *Rhabdovirus carpio* - Metode Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	3
2 Istilah dan definisi	3
3 Peralatan	4
4 Bahan	5
5 Prosedur	5
6 Pembacaan hasil	7
Lampiran A (normatif) Pembuatan media dan pereaksi	9
Lampiran B (informatif) Diagram alur ekstraksi RNA.....	10
Bibliografi	11
Gambar 1 - Hasil PCR <i>Rhabdovirus carpio</i>	8
Tabel 1 - Komposisi bahan sintesa cDNA	6
Tabel 2 - Komposisi bahan amplifikasi pertama	6
Tabel 3 - Pengaturan suhu dan siklus <i>thermal cyclers</i>	6
Tabel 4 - Komposisi bahan amplifikasi kedua (semi <i>nested</i>).....	7

Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang deteksi *Rhabdovirus carpio* - Metode *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

Standar ini disusun oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya dan telah dibahas melalui rapat teknis serta terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 10 November 2011 di Riau yang dihadiri oleh anggota subpanitia teknis, unsur pemerintah, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

- 1 Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.19/Men/2010 tentang Pengendalian sistem jaminan mutu dan keamanan hasil perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 5 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep 01/Men/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 9 April 2012 sampai 8 Juni 2012 dengan hasil akhir RASNI

Deteksi *Rhabdovirus carpio* - Metode *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *Rhabdovirus carpio* pada ikan dengan metode *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

2 Istilah dan definisi

2.1

amplifikasi

pelipatgandaan bagian tertentu dari DNA virus dengan bantuan reaksi enzim *polymerase*

2.2

annealing

proses perlekatan antara *primer* dan *template*

2.3

asam nukleat

bagian dari sel yang membawa informasi genetik kepada keturunannya. asam nukleat yang dibawa virus dapat berupa DNA (asam *deoksiribonukleat*) atau RNA (asam *ribonukleat*)

2.4

***carrier* (pembawa)**

suatu individu yang dalam tubuhnya mengandung organisme spesifik suatu penyakit tanpa menunjukkan gejala-gejala dan mampu membawa infeksi

2.5

denaturasi

proses pemisahan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal

2.6

ekstraksi

proses pemisahan materi genetik virus dari jaringan atau sel

2.7

elektroforesis

proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan pada berat molekul

2.8

extention

proses pembentukan DNA baru

2.9

infeksi sistemik

tipe infeksi dari suatu penyakit yang menginfeksi seluruh tubuh

2.10

penyakit viral

penyakit yang disebabkan oleh virus

2.11

preparasi

proses pemisahan organ target dari tubuh ikan

2.12

PCR

suatu metode *in vitro* yang digunakan untuk mensintesis sekuen tertentu DNA dengan menggunakan dua primer oligonukleotida yang menghibridisasi pita yang berlawanan dan mengagit dua target DNA

2.13

rhabdovirus carpio

merupakan jasad penyebab penyakit dari *spring viraemia of carp* (SVC)

2.14

sintesa cDNA (*reverse transcription/transkripsi balik*)

proses pembentukan DNA komplemen dari RNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*

2.15

***Spring Viraemia of Carp* (SVC)**

penyakit ikan yang disebabkan oleh infeksi *spring viraemia of carp virus* (SVCV), termasuk dalam famili *Rhabdoviridae* dan secara sementara dimasukkan dalam genus *Vesiculovirus*, merupakan *single strand* (ss) RNA virus dengan polaritas negatif, yang dapat menyebabkan infeksi sistemik

2.16

template RNA

RNA hasil ekstraksi yang digunakan sebagai cetakan untuk proses amplifikasi

3 Peralatan

- a) *autoclave*;
- b) elektroforesis;
- c) *freezer* (suhu – 20 °C);
- d) *microwave*;
- e) *hot plate magnetic stirrer*;
- f) mikropipet: 0,2 µl -2 µl; 1µl - 10 µl; 10 µl -100 µl; 20 µl - 200 µl; dan 100 µl – 1 000 µl
- g) mikrosentrifus *refrigerated*;
- h) *minimixer*;
- i) *pellet pestle*;
- j) peralatan bedah, terdiri dari: *pinset*, gunting, dan *scalpel*;
- k) kamera/alat dokumentasi;
- l) *thermal cycler*;
- m) timbangan analitik sensitivity 0.1 mg;
- n) *uv transilluminator*;
- o) *waterbath/heating block*.

4 Bahan

- a) *agarose*;
- b) akuades;
- c) *chloroform* (CHCl_3) p.a/GR;
- d) etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) p.a/GR;
- e) etidium *bromide* ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$);
- f) isopropil alkohol ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$) p.a/GR;
- g) mikrotube ukuran 0,2 ml; 1,5 ml; dan 0,2 ml;
- h) mikrotip-200 μl ; dan 1000 μl
- i) *nuclease free water*;
- j) marker DNA
- k) *moloney-murine leukemia virus reverse transcriptase* (M-MLV RT);
- l) 5 x M-MLV RT *buffer* (250 mM *Tris*, pH 8,3, 375 mM KCl, 100 mM DTT, 30 mM MgCl_2);
- m) formula PCR:
 - 5 x PCR *buffer* (250 mM KCl, 50 mM *Tris*/ HCl, pH 9,0, dan 0,5 % *Triton* X-100) ;
 - MgCl_2 (25 mM);
 - dNTPmix (10 mM);
 - *RedHot* DNA polymerase atau *Taq DNA polymerase* (5 Unit/ μl).
- n) RNA *lysis buffer*
- o) sarung tangan *disposable*;
- p) Primer (100 μM):
 - SVCV F1: 5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR*-R*TC-3'
 - SVCV R2: 5'-AGA-TGG-TAT-GGA-CCC-CAA-TAC-ATH*-ACN*-CAY*-3'
 - SVCV R4: 5'- CTG-GGG-CNN*-CCT-CAA-AGG*-TGY*-3'
- q) *Tris Acetic acid Ethylen* (TAE) *buffer* atau *Tris Boricacid Ethylen diamin tetra acid* (TBE) *buffer*.

CATATAN Pembuatan media dan pereaksi diuraikan dalam Lampiran A.

5 Prosedur

5.1 Preparasi

Organ target berupa jaringan ginjal, insang, limpa, hati, otak, seluruh bagian tubuh ikan (larva) atau pelet hasil sentrifus kultur sel terinfeksi.

5.2 Ekstraksi RNA

- a) haluskan 50 mg - 100 mg organ target menggunakan *pellet pestle* atau pelet hasil sentrifuskultur sel terinfeksi atau ekstrak organ target.
- b) tambahkan 1 ml RNA *lysis buffer*, homogenkan contoh uji.
- c) inkubasi pada suhu ruang (25 °C – 30 °C) selama 5 menit.
- d) tambahkan 200 μl *chloroform* untuk setiap 1 ml RNA *lysis buffer*, lalu homogenkan.
- e) Inkubasikan dalam suhu ruang (25 °C – 30 °C) selama 2 menit - 3 menit.
- f) sentrifugasi dengan kecepatan 12 000 rpm pada suhu 4 °C selama 15 menit.pindahkan supernatan ke dalam *mikrotube* baru.
- g) tambahkan 500 μl isopropil alkohol untuk tiap 1 ml RNA *lysis buffer* yang digunakan.
- h) inkubasikan pada suhu ruang (25 °C – 30 °C) selama 10 menit.
- i) sentrifugasi dengan kecepatan 12 000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit.
- j) buang supernatan.
- k) cuci pelet dengan etanol 75 %, yaitu 1 ml etanol untuk tiap 1 ml RNA *lysis buffer* yang digunakan.
- l) sentrifugasi kembali dengan kecepatan 10 000 rpm pada suhu 4 °C selama 5 menit.

- m) buang supernatan.
n) larutkan RNA dengan 50 µl -100 µl RNase free water.

5.3 Sintesa cDNA

Lakukan reaksi sintesa cDNA (transkripsi balik) pada suhu 37 °C selama 1 jam dengan komposisi seperti pada Tabel 1.

Tabel 1 - Komposisi bahan sintesa cDNA

Komposisi	Volume (µl)
akuabides	8,9
5 x M-MLV RT <i>buffer</i>	4,0
dNTP <i>mix</i> (10 mM)	2,0
primer SVCV R2 (100 µM)	1,0
M-MLV <i>reverse transcriptase</i> (200 U/µl)	0,1
<i>template</i> RNA	4,0

5.4 Amplifikasi

5.4.1 Amplifikasi pertama

Lakukan reaksi PCR dalam volume reaksi 50 µl dengan komposisi seperti pada Tabel 2.

Tabel 2 - Komposisi bahan amplifikasi pertama

Komposisi	Volume (µl)
<i>nuclease free water</i>	31,75
5 x PCR <i>buffer</i>	10,0
MgCl ₂	5,0
dNTP <i>mix</i>	1,0
primer SVCV F1	0,5
primer SVCV R2	0,5
<i>RedHot DNA polymerase/Taq DNA polymerase</i>	0,25
<i>template</i> cDNA	1,0

Atur suhu *thermal cycler* untuk proses amplifikasi pertama seperti yang ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3 - Pengaturan suhu dan siklus *thermal cycler*

Suhu (°C)	Waktu (menit)	Siklus (kali)
95	1	35
55	1	
72	1	
72	10	1

5.4.2 Amplifikasi kedua (semi *nested*)

Lakukan reaksi PCR dalam 50 µl volume reaksi dengan komposisi seperti pada Tabel 4.

Tabel 4 - Komposisi bahan amplifikasi kedua (semi *nested*)

Komposisi	Volume (μl)
<i>nuclease free water</i>	30,25
5 x PCR <i>buffer</i>	10,0
MgCl ₂	5,0
dNTP <i>mix</i>	1,0
primer SVCV F1	0,5
primer SVCV R4	0,5
<i>RedHot DNA polymerase/Taq DNA polymerase</i>	0,25
Produk amplifikasi pertama	2,5

Atur suhu *termal cyclor* untuk proses amplifikasi kedua seperti yang ditampilkan pada Tabel 3.

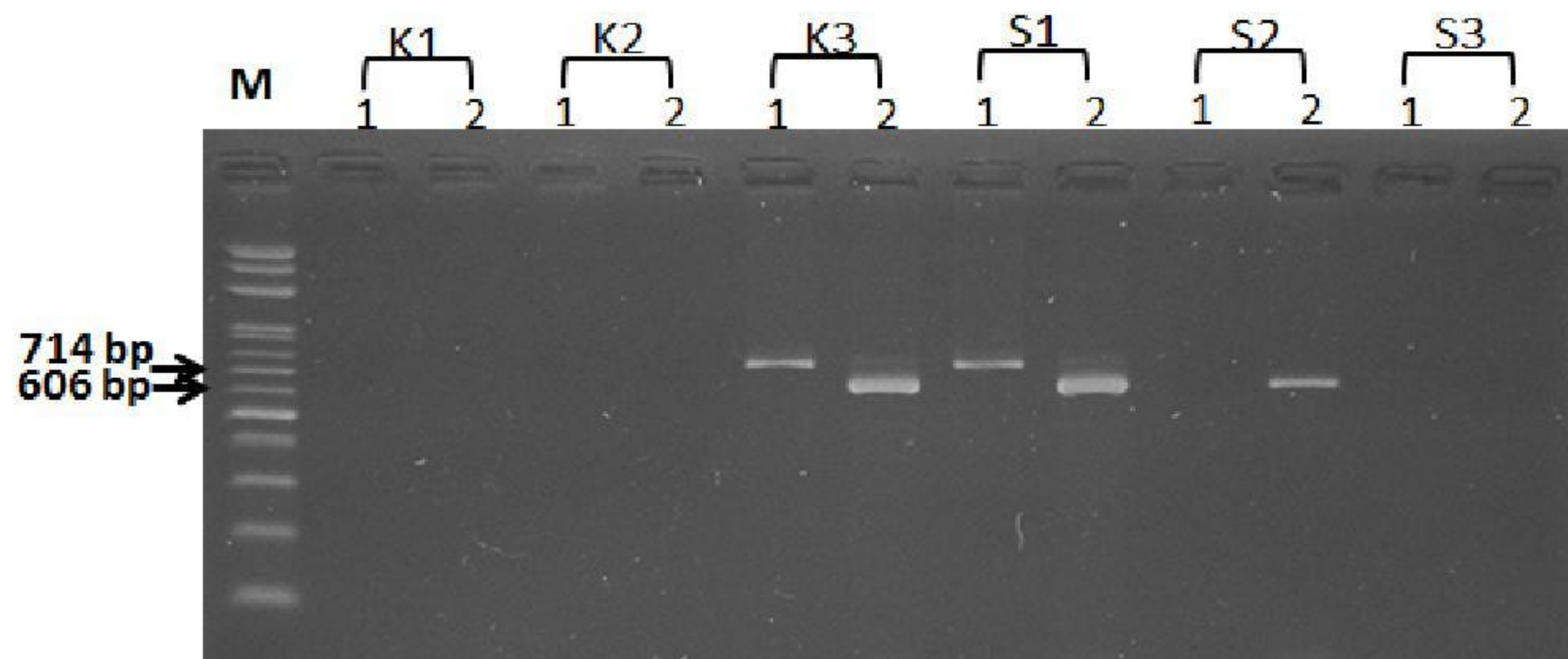
5.5 Elektroforesis

- Campur 10 μl hasil amplifikasi dengan 2 μl *loading dye*.
- Masukkan dalam sumuran pada gel *agarose* 2 %.
- Gunakan marker DNA 100 *base pair* (bp) DNA *ladder*.
- Running* elektroforesis dengan voltase 100 volt - 150 volt hingga *loading dye* bergerak mencapai 2/3 bagian panjang gel *agarose*.
- Warnai hasil elektroforesis dengan 0,5 mg/ml *ethidium bromide* dalam larutan bufer 0,5x TBE/1x TAE selama 10 menit - 15 menit. Kemudian rendam dalam akuades selama 10 menit.

6 Pembacaan hasil

Berdasarkan pola pita pada gel *agarose* setelah proses elektroforesis terhadap produk PCR yang diamati dengan uv *transilluminator*, maka:

- kontrol negatif (*blanko/ nuclease free water*): tidak terlihat adanya pita berukuran 714 bpdan 606 bp ;
- kontrol negatif (DNA negatif *Rhabdovirus carpio*) : tidak terlihat adanya pita berukuran 714 bp dan 606 bp;
- kontrol positif (DNA *Rhabdovirus carpio*): terlihat adanya pita berukuran 714 bp dan 606 bp;
- contoh yang terdeteksi adanya infeksi *Rhabdovirus carpio* apabila terlihat adanya pita berukuran 714 bp dan 606 bp atau 606 bp saja;
- contoh yang tidak terdeteksi adanya infeksi *Rhabdovirus carpio* apabila tidak terlihat adanya pita berukuran 714 bp dan 606 bp.



Keterangan gambar :

- M : marker (100 bp DNA ladder)
- K1: kontrol negatif (*blanko/ nuclease free water*)
- K2: kontrol negatif (DNA negatif *Rhabdovirus carprio*)
- K3: kontrol positif (DNA positif *Rhabdovirus carprio*)
- S1 dan S2 : sampel terdeteksi positif *Rhabdovirus carprio*
- S3: sampel terdeteksi negatif *Rhabdovirus carprio*

Gambar 1 - Hasil PCR *Rhabdovirus carprio*

Lampiran A (normatif) Pembuatan media dan pereaksi

A.1 Buffer TBE

Cara membuat:

- a) Untuk membuat larutan stok 5 kali, masukkan 800 ml akuades ke dalam beaker berkapasitas 1 l.
- b) Timbang 54 g *Tris base* dan 27,5 g asam borat.
- c) Masukkan keduanya ke dalam beaker yang telah berisi akuades dan aduk dengan *magnetic stirrer* sampai terlarut.
- d) Masukkan 20 ml 0,5 M EDTA, aduk sampai tercampur rata.
- e) Tambahkan akuades sampai 1 l.
- f) Masukkan dalam botol reagen dan sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.
- g) Untuk membuat larutan siap pakai yang mengandung 0,045 M *Tris-boric* dan 0,001 M EDTA, larutkan 1 bagian larutan stok dengan 9 bagian akuades.

A.2 Buffer TAE

Cara membuat :

- a) Untuk membuat larutan stok 50 kali, masukkan 800 ml akuades ke dalam beaker berkapasitas 1 l.
- b) Timbang 242 g *Tris base*.
- c) Masukkan ke dalam beaker yang telah berisi akuades dan aduk dengan *magnetic stirrer* sampai terlarut.
- d) Masukkan 57,1 ml asam asetat glasial dan 100 ml 0,5 M EDTA, aduk sampai tercampur rata.
- e) Tambahkan akuades sampai 1 l.
- f) Masukkan dalam botol reagen dan sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.
- g) Untuk membuat larutan siap pakai yang mengandung 40 mM *Tris-acetate* dan 1 mM EDTA, larutkan 1 bagian larutan stok dengan 49 bagian akuades.

A.3 Pembuatan 0,5 M EDTA pH 8

Cara membuat:

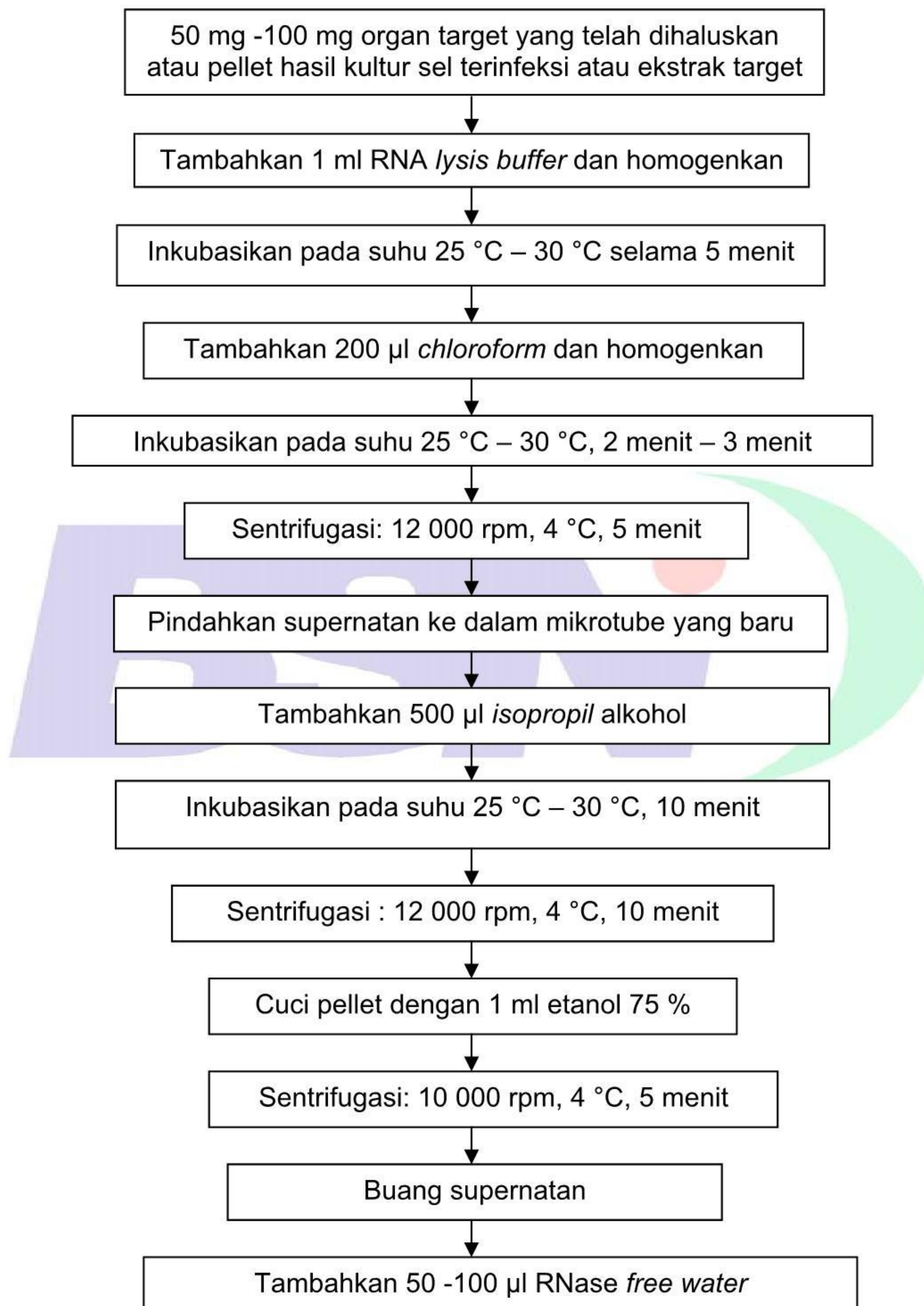
- a) Tambahkan 186,1 g *disodium ethylene diamine tetra acetate-2H₂O* dalam 800 ml akuades
- b) Aduk dengan *magnetic stirrer*.
- c) Atur sampai pH 8 dengan menambahkan NaOH (20 g NaOH pellet).
- d) Sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.

A.4 Gel Agarose

Cara membuat:

- a) Buat gel agarose 2 % dengan melarutkan 2 g *agarose* dalam 100 ml larutan bufer 0,5x TBE/1x TAE.
- b) Didihkan hingga larutan menjadi bening.
- c) Tuang *agarose* setelah suhunya mencapai sekitar 60 °C pada cetakan gel *agarose* yang telah dipasang dengan sisir.

Lampiran B
(informatif)
Diagram alur ekstraksi RNA



Bibliografi

Koutna, M., Vesel, T., Psikal, I. & Hulova, J. 2003. *Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR*. Dis. Aquat. Org. 55: 229 – 235.

OIE, 2011. *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal*. Office des International des Epizooties (OIE).

Shivappa, R., Kozlowicz, S., Rolland, J., Corsin, F., Way, K. & Levine, J. 2008. *Spring viremia of carp in the United States of America: evaluation of current diagnostics*, pp. 143-156. In Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, M. and Subasinghe, R.P. (eds.). *Diseases in Asian Aquaculture VI*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 505 pp

